

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.07.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 3 年 7 月 9 日

REC'D 16 SEP 2004

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 2 7 2 3 9 8
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 2 7 2 3 9 8]

WIPO

PCT

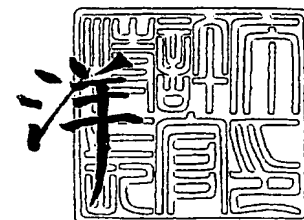
出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 418T03010
【提出日】 平成15年 7月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C09K 1/00
C09K 3/00

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 水上 富士夫

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 清住 嘉道

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 池田 拓史

【発明者】
【住所又は居所】 宮城県仙台市宮城野区苦竹四丁目 2 番 1 号 独立行政法人産業技術総合研究所東北センター内
【氏名】 川合 章子

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市中別府 5 9 0 - 1 4 2
【氏名】 坂口 謙吾

【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区今井町 5 1 5 - 6
【氏名】 知久 浩之

【特許出願人】
【持分】 80/100
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】
【持分】 20/100
【識別番号】 501463199
【氏名又は名称】 坂口 謙吾

【代理人】
【識別番号】 100102004
【弁理士】
【氏名又は名称】 須藤 政彦
【電話番号】 03-5202-7423

【持分の割合】 20/100
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 053327
【納付金額】 4, 200円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の機能を賦活する方法であって、該タンパク質をゼオライトベータに接触させることにより、該タンパク質固有の本来機能を発現させ得る状態にすることを特徴とするタンパク質の機能賦活方法。

【請求項 2】

該タンパク質を、タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォルディングバッファの存在下で、ゼオライトベータと接触させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で産生されたタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ゼオライトベータを含む溶液との混合、又はゼオライトベータ充填カラムへの注入により、タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで脱着させる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォルディングすることを特徴とするタンパク質の主体構造の改変方法。

【請求項 7】

高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォルディングすることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が賦活されたタンパク質を製造することを特徴とする活性タンパク質の製造方法。

【請求項 8】

目的のタンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込んだ大腸菌により産生された不活性タンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォルディングする、請求項 7 に記載のタンパク質の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】不活性タンパク質の機能賦活方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法に関するものであり、更に詳しくは、高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化し、失活したタンパク質をリフォルディングさせ、該タンパク質固有の本来機能を賦活・再生させることを可能とする不活性タンパク質の機能賦活方法、及び該方法を利用した活性タンパク質の製造方法に関するものである。本発明は、例えば、生化学品、医薬品製造の技術分野において、大腸菌等の遺伝子発現系を利用して生産した高次構造未形成タンパク質を、リフォルディングさせ、該タンパク質の本来の機能・活性を賦活させることが可能な新しいタンパク質の機能賦活方法等を提供するものとして有用である。従来、一般に、大腸菌等の発現系で得られるタンパク質は、立体構造が無秩序であり、該タンパク質の持つ本来の機能・活性を持たず、活性を示さない、という問題があったが、本発明の方法は、上記タンパク質に代表される不活性タンパク質の機能・活性を賦活し、所定の機能・活性を有するタンパク質に再生することを可能にする革新的なタンパク質合成技術を提供するものである。

【背景技術】

【0002】

生体内で实际的に作用し、働くのは遺伝子ではなく、それから作られるタンパク質である。したがって、タンパク質の機能・構造の解明・解析は、例えば、病気の治療や創薬に直結し、極めて重要である。このため、従来、種々のタンパク質を様々な方法で合成・生産し、それらの構造を調べ、生体内における作用機構と役割を解明することが活発に行われている。そして、今や、タンパク質の機能は、それらを構成するアミノ酸の配列・鎖長のみならず、それらの取る秩序だった立体構造（高次構造）によって決まることが周知のこととなっている。

【0003】

タンパク質の合成は、一般には、大腸菌、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の発現系を用いて行われる。昆虫細胞や哺乳動物細胞によるタンパク質合成では、得られるタンパク質は、高次構造が制御され、秩序だった立体構造を取り、可溶性である場合が多い。しかし、これらの方法は、タンパク質の分離精製の操作が非常に煩雑であり、目的タンパク質を得るまでに時間がかかり、コスト高となるばかりか、得られるタンパク質の量も極めて少ない、という欠点がある。これに対して、大腸菌によるタンパク質合成は、操作が簡単であり、目的タンパク質を得るのにさして時間を要せず、コストもさほどかからない。このため、現在は、目的タンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込ませた大腸菌を用いる方法が、タンパク質合成の主流となっており、その生産プロセスも確立されつつある。

【0004】

ところが、ヒトなどの高等生物のタンパク質を大腸菌の発現系で合成した場合、アミノ酸の結合順序や数、すなわちアミノ酸鎖長に関しては、設計どおりのタンパク質が得られるものの、その立体構造には秩序が無く、高次構造が制御されていないタンパク質、すなわち、アミノ酸鎖が纏れ絡まった、いわゆるインクルージョンボディと呼ばれる不溶性タンパク質が得られる。当然のことながら、この不溶性タンパク質のインクルージョンボディは、欲する機能・性能を持たず、活性を示さない。このため、大腸菌によるタンパク質生産プロセスでは、インクルージョンボディを解きほぐし、高次構造を整え、秩序だった立体構造を持つ可溶性タンパク質に変換する操作、すなわちインクルージョンボディのリフォルディング（巻き戻し）が必要である。

【0005】

この種のリフォルディングは、大腸菌により生産されたタンパク質のみならず、熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質の再生にも応用でき、極めて重要な技術である。したがって、従来、このリフォルディングは、盛んに研究され、種々の方法が提案されて

いるが、それらのほとんどは、リフォルディング率が低いうえに、ある限定されたタンパク質（特に、分子量の低い特定タンパク質）に対して偶発的に好ましい結果が得られたに過ぎないことも多く、現在、このリフォルディングは、種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォルディング率の高い効率的な方法とはなっていない。

【0006】

最も古くから良く用いられているリフォルディング操作には、透析や希釈が用いられている。前者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かし、これを界面活性剤や変性剤を含まない緩衝液で透析することで、界面活性剤や変性剤の濃度を下げて、タンパク質をリフォルディングするもの（典型例：FoldIt キット、Hampton Research社製）である。一方、後者は、タンパク質を界面活性剤や変性剤を含む水溶液に溶かした後に、これを単に希釈して行くことで界面活性剤や変性剤の濃度を下げ、リフォルディングさせるもの（典型例：FoldIt

キット、Hampton Research社製）である。これらが一般的で

あるが、その他にも、界面活性剤のSodium N-lauroyl sarcosinate溶液にグルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質を溶かし、それを1～2%のTriton

X-100で希釈し

、巻き戻す方法（非特許文献1参照）など、希釈剤を用いてリフォルディングさせる場合もある。

【0007】

透析と希釈の両方に対し、Hampton Research社から使い捨てキットが市販されており、これらの操作法では、Ligand binding domains from glutamate and kainate receptors

、Lysozyme、Carbonic anhydrase Bなどの極限られたタンパク質でリフォルディングが起こることが発見されている（非特許文献2参照）、に過ぎず、試行錯誤法の域にとどまっていると言っても過言ではない。したがって、たまたま上手くいった場合があっても他のタンパク質に適用した場合はほとんどうまくいかないのが通例である。

【0008】

リフォルディングに吸着分離カラムを用いることも試されている。尿素・塩酸グアニジンで変性させたタンパク質、チオレドキシンをゲル濾過にかけると、ゲル濾過中にその巻き戻りが起こる（非特許文献3参照）。しかし、この方法では、リフォルディングは必ずしも十分ではなく、他のタンパク質では満足できる結果が得られないのが通常である。構造が壊れたタンパク質の巻き戻しを促進するタンパク質の一種である分子シャペロンGroELを固定したカラムに、8Mの尿素で可溶化したタンパク質を吸着させ、塩化カリウムと尿素をそれぞれ2M含む溶液で溶離すると、溶離タンパク質の巻き戻りが起こる（非特許文献4参照）。

【0009】

しかし、これらは、Cyclophilin Aなどの極めて限られたタンパク質で認められているに過ぎない。また、リフォルディング促進に関与すると考えられるタンパク質3種、GroEL、DsbA（大腸菌のdisulfide oxidoreductase）及びPPI（human proline

cis-trans isomerase）を同時に固定した樹脂に、塩酸グアニジンで変性したタンパク質Scorpion toxin Cn5を混ぜると、このタンパク質の巻き戻りが樹脂上で起こること（非特許文献5参照）、も報告されているが、これについては、Scorpion toxin Cn5などの特定タンパク質にし

か適用できない欠点に加え、タンパク質3種を固定した樹脂の調製が煩雑でコスト高となるという問題もある。

【0010】

カラム上の固定物質として、巻き戻し、タンパク質の代わりに金属キレートを用いる場合もある。ニッケルキレートを固定した樹脂に、塩酸グアニジンと尿素を含む水溶液で溶

解変性したHis6-タグ融合タンパク質を吸着させ、変性剤を含まない緩衝溶液で洗うと、該融合タンパク質の巻き戻りが起こる（非特許文献6参照）。しかし、この方法の適用は、このタンパク質に限られることと、樹脂の調製が煩雑でコスト高となることは前記のものと同一である。

【0011】

人工シャペロンとして、 β -シクロデキストリンやシクロアミラーゼを用い、このシャペロン溶液に界面活性剤で変性したタンパク質を混ぜると、界面活性剤の人工シャペロンによる取り込み除去が生じ、この過程でタンパク質が巻き戻るとの報告（非特許文献7～9参照）、もある。しかし、この方法は、carbonic anhydrase Bなどで成功しているに過ぎないし、しかも、繰り返し行える方法ではなく、高コストである。

【0012】

【非特許文献1】Anal. Biochem. Vol. 210 (1993) 179-187

【非特許文献2】Protein Sci. Vol. 8 (1999):1475-83

【非特許文献3】Biochemistry, Vol. 26 (1987), 3135-3141

【非特許文献4】Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 94 (1997) 3576-3578

【非特許文献5】Nat. Biotechnol. Vol. 17 (1999) 187-191

【非特許文献6】Life Science News(Japan Ed.) Vol. 3 (2001) 6-7

【非特許文献7】J. Am. Chem. Soc. Vol. 117 (1995) 2373-2374

【非特許文献8】J. Biol. Chem. Vol. 271 (1996) 3478-3487

【非特許文献9】FEBS Lett. Vol. 486 (2000) 131-135

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

このように、従来、種々のリフォルディングの方法が報告されているが、これらの方法には、上記のような問題があるのが実情であり、そのために、当技術分野においては、鎖長の長短を問わず種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用可能な、一般性、普遍性の高い、しかも繰り返し使用可能な低コストの高効率リフォルディング法を開発することが急務の課題となっていた。

【0014】

このような状況下にあつて、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、上述の課題を解決することが可能な新しいリフォルディング技術を開発することを目標として鋭意研究開発を進めると共に、DNA、RNA、タンパク質等バイオポリマーのゼオライト等金属酸化物上への吸着状況を詳細に調べ（Chem. Eur. J. Vol. 7 (2001) 1555-1560）、タンパク質の分離精製方法を鋭意研究している過程で、大腸菌等の発現系で生産した高次構造未形成タンパク質、あるいは熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質をゼオライトベータで処理すると、それらのタンパク質が本来の機能・活性を示すようになること、そして、この方法は、本発明を、分子量10万を越える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォルディングに適用できる、一般性、普遍性の高い方法として使用し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【課題を解決するための手段】

【0015】

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質の機能を賦活する方法であつて、該タンパク質をゼオライトベータに接触させることにより、該タンパク質固有の本来機能を発現させ得る状態にすることを特徴とするタンパク質の機能賦活方法。

(2) 該タンパク質を、タンパク質変性剤、界面活性剤及び／又はリフォルディングバッファの存在下で、ゼオライトベータと接触させる、前記(1)に記載の方法。

(3) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、大腸菌の発現系で産生されたタンパク質である、前記(1)に記載の方法。

(4) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質が、熱履歴の原因で失活したタン

パク質である、前記(1)に記載の方法。

(5) ゼオライトベータを含む溶液との混合、又はゼオライトベータ充填カラムへの注入により、タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで脱着させる、前記(1)に記載の方法。

(6) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォoldingすることを特徴とするタンパク質の主体構造の改変方法。

(7) 高次構造が無秩序なため不活性であるタンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォoldingすることにより、高次構造が制御されて該タンパク質固有の本来機能が賦活されたタンパク質を製造することを特徴とする活性タンパク質の製造方法。

(8) 目的のタンパク質の合成を担う遺伝子コードを組み込んだ大腸菌により産生された不活性タンパク質をゼオライトベータに接触させて該タンパク質の立体構造をリフォoldingする、前記(7)に記載のタンパク質の製造方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法等に係るものであり、本発明によって、1) 大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質の本来の機能・活性をリフォoldingにより賦活させることができる、2) この方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォoldingする方法として有用である、3) 種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォolding率の高い効率的な方法を提供できる、4) 本発明で用いる機能賦活剤のゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である、5) この方法は、分子量10万を超える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォoldingに適用できる、6) 例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本発明の方法を組み合わせることにより、高次構造の制御されて該タンパク質固有の本来機能がタンパク質を生産する新しい活性タンパク質の製造プロセスを構築することができる、という効果が奏される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明では、機能賦活の対象となるタンパク質としては、一般には、大腸菌等の発現系で得られる立体構造が無秩序なタンパク質、いわゆるインクルージョンボディ、あるいは熱履歴等のある種の原因で失活したタンパク質が用いられる。本発明では、これらのタンパク質をゼオライトベータで処理して該タンパク質の立体構造をリフォoldingすることにより、該タンパク質固有の本来機能の賦活を行う。賦活操作は、通常、該タンパク質を変性剤や界面活性剤などを含む溶液に先ず分散溶解し、その後、ゼオライトベータを含む溶液との混合や、ゼオライトベータ充填カラムへの注入により、該タンパク質をゼオライトベータに吸着させ、次いで、ゼオライトベータから該タンパク質を脱着させる手順で行われる。本発明で機能賦活剤として用いられるゼオライトベータとしては、未焼成ゼオライトベータ、及び例えば、合成ゼオライトベータを300～500℃で3～10h焼成した焼成ゼオライトベータが例示されるが、これらに制御されるものではなく、これらと同等のものであれば同様に使用することができる。

【0018】

ゼオライトベータに吸着前のタンパク質の分散溶媒としては、一般には、それが大腸菌等の発現系で生産されること、及びタンパク質は、通常、水溶液中で使われることが多く、失活した場合でも水溶液中にあることが多いことから、好適には、例えば、水が用いられる。しかし、必ずしもこれに限定されるものではなく、該タンパク質と反応を起こさないもの、及び該タンパク質の立体構造を不本意な形に変えるものでなければ、基本的には問題はなく、このような場合は、それらの溶媒単独あるいは水と混合して用いることが可

能である。この種の溶媒の典型例として、一価及び多価のアルコールをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

【0019】

該タンパク質の吸脱着は、一般には、インクルージョンボディなど、纏れ絡んだタンパク質鎖長を解きほぐし易くし、また、巻き戻り易くするために、変性剤や界面活性剤、pH調整剤、リフォルディング因子等の存在下、及び／又はタンパク質鎖長中に不本意に生成したS-S結合を切断するために、ある種の還元剤の存在下、で行われる。この種の変性剤や界面活性剤、pH調整剤、リフォルディング因子の典型例として、例えば、塩酸グアニジン、トリスアミノメタン塩酸塩、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic

acid (HEPES)、ポリリン酸、スクロース

、グルコース、グリセロール、イノシトール、Dextran T-500 やFicoll400などを挙げるができるが、これらにとどまるものではなく、同様な作用を持つものはいずれも使用可能である。

【0020】

不本意に生成したS-S結合を切断し、本来の構造に戻す還元剤としては、安価で入手し易いことから、通常は2-メルカプトエタノールが用いられるが、これに限定されるものではなく、同様な作用を有するものは全て使用可能である。当然のことながら、タンパク質鎖長が解きほぐれやすい場合や、不本意にS-S結合が生成しない場合は、変性剤や界面活性剤、及び／又は防止剤を必ずしも使う必要がないので、これらの存在は常に必須とは限らず、状況に応じ適宜選択して用いられる。また、それらを用いる場合も、それらの量は状況に応じ適宜決められることになる。

【0021】

また、該タンパク質の脱着には、一般には、置換吸着が用いられるが、基本的には該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まない操作であれば、いかなる操作も適用可能であり、特に限定されるものではない。したがって、pH変化、温度変化なども用いることができる上に、これらと置換吸着を併用することもできる。置換吸着で該タンパク質の脱着を促す物質には、一般的には、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)などの界面活性剤やハロゲン化アルカリなどの塩が用いられるが、これらに限定されるものではなく、該タンパク質の脱着後の機能賦活を阻まないものであれば、通常、カラムクロマトグラフィーでの溶離に用いられるものなど、種々のものが使用可能である。

【0022】

更に言えば、該タンパク質の該ケイ酸塩への吸着、あるいはそれからの脱着を促すために、上記操作と併用して、種々の付加的操作を行うこともできる。このような操作の典型例には、例えば、超音波やマイクロ波の照射や、磁場や電場の印加等がある。以上述べてきた本発明の手順・操作により、大腸菌等の発現系を用いて生産した高次構造未形成タンパク質、並びにある種の原因で失活したタンパク質に、リフォルディングが起き、それらのタンパク質が持つ本来の機能が速やかに賦活される。本発明の機能賦活剤のゼオライトベータは、熱的、化学的に極めて安定であり、しかも安価であるうえ、繰り返し使用が可能であるので、本発明は、例えば、生化学品製造、医薬品製造にとってきわめて有用であり、その経済的効果は計り知れないものがある。

【実施例】

【0023】

次に、実施例及び比較例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例等によって何ら限定されるものではない。

実施例及び比較例

以下、本実施例では、大腸菌発現系生産タンパク質及び変性タンパク質の機能賦活を説明するが、本発明は、これら実施例に限定・制限されるものではない。

1) 試料等の調製

(a) 機能賦活剤

機能賦活剤として、後記する表1に示した未焼成ゼオライトベータ (Na-BEA)、表1に示した合成ゼオライトベータ、及びそれを焼成した焼成ゼオライトベータ及び表1の比較例1~15に示した比較製品を使用した。

(b) 変性タンパク質溶液

タンパク質として、表1の「タンパク質」及び「備考」に示した内容のRPA70 (黄色ショウジョウバエ由来)、P53 (ヒト由来) 等を使用した。

(c) リフォールディングバッファー

ゼオライトとしてNa-BEA、タンパク質としてRPA70を用いて、リフォールディングバッファーの塩濃度を検討した。リフォールディングバッファーは、20mM Tris HCl pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、2.5 (w/v) % polyethylene glycol 20,000、非イオン系界面活性剤を用い、界面活性剤としては1 (v/v) % Tween20、Triton X-100、及びNP-40を用いた。後記する表2に、実施例及び比較例で実際に用いたリフォールディングバッファーの詳細を示す。

【0024】

2) リフォールディング操作

1. 5mlのエッペンドルフチューブに100mgの機能賦活剤を入れ、0.5mlの6M塩酸グアニジン、20mM トリスアミノメタン三塩酸塩 (Tris HCl) pH7.5、0.5M NaCl、及び20mM 2-メルカプトエタノールを加えて懸濁した。これに、6M塩酸グアニジン、及び20mM 2-メルカプトエタノールを加え、氷上で1時間放置し、変性したタンパク質溶液 (濃度は0.5~1.0mg/ml) を0.5ml加えた。この混合液を、該タンパク質の機能賦活剤上への吸着を確実にするために、低温室に置かれたROTARY CULTURE RCC-100 (IWAKI GLASS社製) で、1時間攪拌した。

【0025】

その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、上澄みを除去した。次に、この沈殿した機能賦活剤からタンパク質変性剤を完全に除去するために、これを1mlの20mM Tris HCl pH7.5、20mM 2-メルカプトエタノールで4回洗った後、10000×gで5秒間遠心し、更に、生じた上澄みを捨てた。残った機能賦活剤に、1mlのリフォールディングバッファー (50mM HEPES pH7.5、0.5M NaCl、20mM 2-メルカプトエタノール、リフォールディング因子及び非イオン系界面活性剤から構成) を加え、懸濁した。

【0026】

機能賦活剤上に吸着した該タンパク質を脱着・溶離させるために、この懸濁液を再び低温下のROTARY CULTURE RCC-100 (IWAKI GLASS社製) で攪拌した。その後、10000×gで5秒間遠心して、機能賦活剤を沈殿させ、該タンパク質を含む上澄みを新しいエッペンドルフチューブに移し、活性測定 (アッセイ) に用いた。

なお、活性測定には、用いたタンパク質の働きに応じた方法を採用した。具体的には、三種の測定、すなわちゲルシフトアッセイ、ポリメラーゼアッセイ及びリゾチーム活性測定で行った。

【0027】

3) 活性測定操作

(a) ゲルシフトアッセイ

1pmolの放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドDNAとリフォールディングしたタンパク質を、組成25mM HEPES pH7.4、50mM KCl、20% glycerol、0.1% NP-40、1mM DTT、及び1mg/ml bovine serum albuminの溶液中で、氷上30分インキュベートし、4.5%のポリアクリルアミノゲルで0.5×TBEのバッファーを使い、4℃で電気泳動した。その結果を図1、及び図3に示す。

タンパク質にDNA結合性がある(すなわち活性がある)場合、DNAにタンパク質が結合し、これにより、電気泳動が遅くなり、バンドがシフトするので、これにより活性(すなわちリフォolding率)を判定した。

【0028】

(b) ポリメラーゼアッセイ

鋳型DNAとして、poly(dA) oligo(dT)₁₂₋₁₈、あるいはDNase I-activate calf thymus DNAを使用し、反応液には、組成(終濃度) 50 mM TrisHCl pH7.5、1 mM DTT、15% glycerol、5 mM MgCl₂、0.5 μM dTTP (cold) (チミジル酸三リン酸)、[³H]-dTTP (5 mCi/ml: 100-500 cpm/pmol) のものを用いた。まず、この反応液の濃度が2倍のもの10 μlにタンパク質(酵素)サンプル溶液を加え、懸濁した後37℃で1時間インキュベートした後、氷上に置き反応を停止させた。

【0029】

その後、正方形に切ったDE81紙に反応液を滴下し、乾燥させた後、ビーカーの中に移して、未反応dTTPを溶解除去するために洗浄した。洗浄は、まず5%リン酸水素二ナトリウム水溶液で3回洗い、次いで、蒸留水で3回、更に、エタノールで2回洗い、その後、乾燥した。このようにして得た乾燥DE81紙を、シンチレーターが入ったバイアルに入れ、シンチレーションカウンターで放射活性(cpm)を測定した。酵素サンプルの活性が強いほど、それで合成されるDNAに放射性同位体で標識したdTTPがより多く取り込まれ放射活性が高くなるので、これにより、タンパク質の活性を判定した。図2に、Tween 20を用いてリフォoldingされたタンパク質の回収率、及び活性の回復率を示す。

【0030】

(c) リゾチームの活性測定

基質に細菌M. lysodeikticusを選び、これを50 mMリン酸バッファーで懸濁し、0.16 mg/ml濃度の基質溶液を調製した。この基質溶液480 μlに20 μlのタンパク質(酵素リゾチーム)溶液を加え、室温で30分間インキュベートした。その後、波長450 nmの吸光度を測定した。

リゾチームは細菌の細胞壁を分解する能力があるので、その能力、すなわち活性が高いほど吸光度は減少する。リゾチーム活性1 unitは1分間あたりに450 nmの吸光度が0.001減少することと定義した。

【0031】

上記手順・操作で得られた本実施例の結果である、活性(リフォolding率)、タンパク質回収率を、表1に、比較例の結果と共に纏めた。尚、実施例及び比較例で用いたリフォoldingバッファーを表2に示す。実施例に示されるように、リフォoldingにより、DNA結合活性等のタンパク質本来の活性が得られることが分かった。本発明は、種々の高次構造未形成並びに変性・失活タンパク質に適用できる、一般性、普遍性の高いリフォolding法として有用であり、その適用は、実施例に示されたタンパク質に限定されるものではなく、任意のタンパク質に適用し得るものである。

【0032】

【表 1】

機能顕活剤	タンパク質	活性(ワイルディング率): タンパク質回収率	備考
実施例 1	未精製ゼオライトベータ(市販品 Na-BEA)	DNA結合活性有(大)	大腸菌で合成し沈殿したものを使用、分子量86kDa
実施例 2	同上	DNA結合活性有(中)	図1参照
実施例 3	同上	DNA結合活性有(小)	図1参照
実施例 4	同上	DNA結合活性有(大): 約90%; 20%	図1参照
実施例 5	同上	DNA結合活性有(大)	図2参照
実施例 6	同上	DNA結合活性有(大)	図2参照
実施例 7	同上	DNA結合活性有(大): 約80%; 16%	図2参照
実施例 8	同上	DNA結合活性有(大): 約95%; 23%	図2参照
実施例 9	同上	DNA結合活性有(大): 約95%; 22%	図2参照
実施例 10	同上	DNA結合活性有(大): 90%; 19%	図3参照
実施例 11	同上	DNA結合活性有(小)	図3参照
実施例 12	同上	DNA結合活性有(大)	図3参照
実施例 13	同上	DNA結合活性有(大): 100%	図3参照
実施例 14	同上	DNA結合活性有(大): 約100%	
実施例 15	同上	DNA結合活性有(中): 49.3%	
実施例 16	同上	DNA結合活性有(中): 64.7%	
実施例 17	同上	DNA結合活性有(中): 64.4%	
実施例 18	同上	DNA結合活性有(中): 39.2%	
実施例 19	同上	DNA結合活性有(大): 72.2-77.4%	
実施例 20	同上	DNA結合活性有(大): 24.3%	
実施例 21	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 22	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 23	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 24	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 25	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 26	同上	DNA結合活性有(大)	
実施例 27	同上	DNA結合活性有(小)	
実施例 28	同上	DNA結合活性有(小)	
実施例 29	同上	DNA結合活性有(小)	
実施例 30	同上	DNA結合活性有(小)	
比較例 1	ゼオライト K-LTL	DNA結合活性無	
比較例 2	ゼオライト H-Y	DNA結合活性無	
比較例 3	ゼオライト H-USY330	DNA結合活性無	
比較例 4	ゼオライト H-USY380	DNA結合活性無	
比較例 5	ゼオライト K-FER	DNA結合活性無	
比較例 6	Na-LSX	DNA結合活性無	
比較例 7	RUB-15	DNA結合活性無	
比較例 8	カネマイト®	DNA結合活性無	
比較例 9	HOM(pore 7nm)	DNA結合活性無	
比較例 10	HOM(pore 5nm)	DNA結合活性無	
比較例 11	HOM(pore 6nm)	DNA結合活性無	
比較例 12	PLS	DNA結合活性無	
比較例 13	MCM-22	DNA結合活性無	
比較例 14		DNA結合活性無	
比較例 15		DNA結合活性無	

【0033】

【表 2】

		リフォールディングバッファー	
実施例 1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子/非イオン系界面活性剤		
実施例 2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20		
実施例 3	50mM HEPES pH7.5/0.2M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20		
実施例 4	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/リフォールディング因子無/1(v/v)% Tween 20		
実施例 5	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 6	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Triton X-100		
実施例 7	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% NP-40		
実施例 8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/0.5(v/v)% Tween 20		
実施例 9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20		
実施例 10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/3(v/v)% Tween 20		
実施例 11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/2.5(w/v)%PEG20K/5(v/v)% Tween 20		
実施例 12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20		
実施例 13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20		
実施例 14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20		
実施例 15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG8000/1(v/v)% Tween 20		
実施例 16	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PEG3350/1(v/v)% Tween 20		
実施例 17	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/10.0(w/v)%PEG200/1(v/v)% Tween 20		
実施例 18	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 19	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0(w/v)%PPG2000/1(v/v)% Tween 20		
実施例 20	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/5.0(w/v)%PPG400/1(v/v)% Tween 20		
実施例 21	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/1.0-5.0%Ficoll70/1(v/v)% Tween 20		
実施例 22	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.1% β -cyclodextrin/1(v/v)% Tween 20		
実施例 23	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 24	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 25	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 26	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20		
実施例 27	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 28	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 29	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
実施例 30	50mM HEPES pH7.5/0.1M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 1	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 2	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 3	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 4	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 5	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 7	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 8	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 9	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 10	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 11	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 12	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 13	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 14	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/1(v/v)% Tween 20		
比較例 15	50mM HEPES pH7.5/0.5M NaCl/20mM 2-メルカプトエタノール/0.5(w/v)%PEG20K/2(v/v)% Tween 20		

【産業上の利用可能性】

【0034】

以上詳述したように、本発明は、不活性タンパク質の機能賦活方法等に係るものであり、本発明によって、1) 大腸菌等の発現系で産生された高次構造が未形成なために不活性なタンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化して失活したタンパク質の本来の機能・活性をリフォールディングにより賦活させることができる。2) この方法は、インクルージョンボディを効率よくリフォールディングする方法として有用である。3) 種々のタンパク質に適用可能な、一般性、普遍性のある、しかもリフォールディング率の高い効率的な方法を提供できる。4) 本発明で用いる機能賦活剤のゼオライトベータは、低コストであり、しかも、繰り返し使用可能である。5) この方法は、分子量10万を超える大型のタンパク質を含む種々の立体構造無秩序タンパク質のリフォールディングに適用できる。6) 例えば、大腸菌の発現系によるタンパク質合成プロセスと本発明の方法を組み合わせることにより、高次構造の制御されて該タンパク質固有の本来機能がタンパク質を生産する新しい活性タンパク質の製造プロセスを構築することができる。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】電気泳動によるゲルシフトアッセイの結果を示す。

【図2】リフォールディングされたタンパク質の回収率、及び活性の回復率を示す。

【図3】電気泳動によるゲルシフトアッセイの結果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

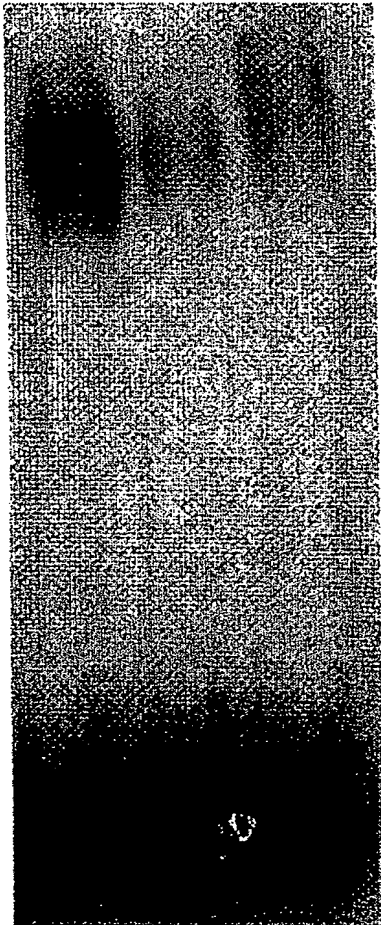
(レーン：1(v/v)%非イオン系界面活性剤)

1 : Tween20

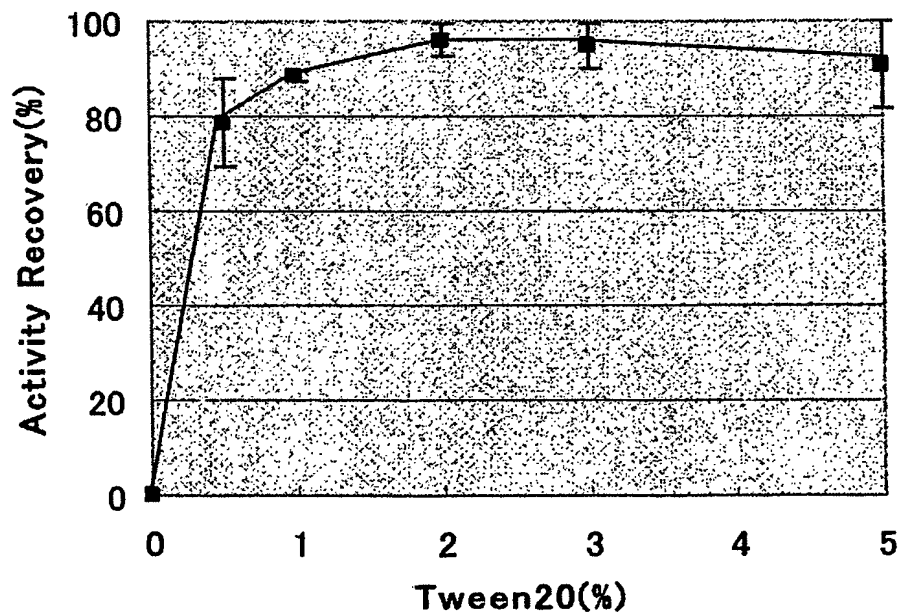
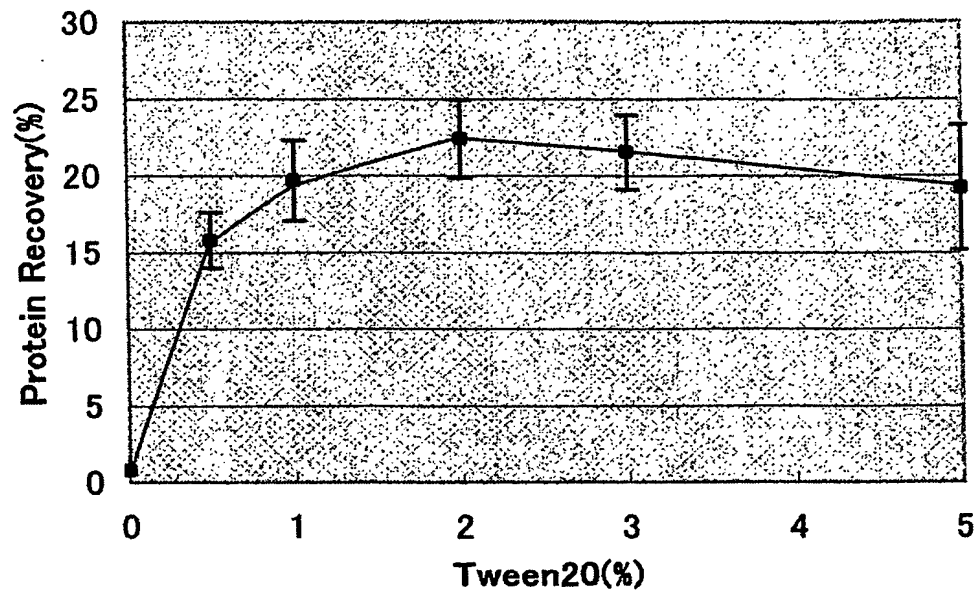
2 : Triton X-100

3 : NP-40

1 2 3



【図 2】



* エラーバーは標準偏差

【図 3】

(レーン：リフォールディング因子)

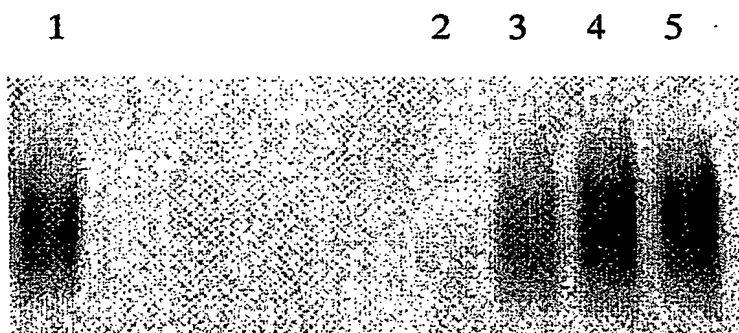
1 : なし

2 : 10(w/v)% polyethylene glycol 8,000

3 : 5.0(w/v)% polyethylene glycol 8,000

4 : 1.0(w/v)% polyethylene glycol 8,000

5 : 0.5(w/v)% polyethylene glycol 8,000



(シフトしていないバンドは除去した)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 大腸菌等で生産した高次構造未形成による不活性タンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化し失活したタンパク質のリフォルディング、すなわち機能賦活方法等を提供する。

【解決手段】 大腸菌等で生産した高次構造未形成による不活性タンパク質、あるいはある種の原因で立体構造が変化し失活したタンパク質を、ゼオライトベータで処理することにより、該タンパク質固有の本来の機能・活性を賦活する方法、及び該方法を利用した活性タンパク質の製造方法。

【効果】 従来の方法と比べて、汎用性、普遍性が高く、かつ操作が簡単で容易であり、安価で、機能賦活剤の繰り返し使用も可能である新しいタンパク質の機能賦活方法を提供できる。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届
【整理番号】 418T03010
【提出日】 平成16年 7月 6日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2003-272398
【承継人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所
【承継人代理人】
【識別番号】 100102004
【弁理士】
【氏名又は名称】 須藤 政彦
【電話番号】 03-5202-7423
【その他】 平成16年7月6日付けで特願2003-272398に係る代理権を証明する書面が提出されています。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-272398
受付番号	50401138970
書類名	出願人名義変更届
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成 16 年 8 月 9 日

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】	301021533
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1-3-1
【氏名又は名称】	独立行政法人産業技術総合研究所

【承継人代理人】

申請人

【識別番号】	100102004
【住所又は居所】	東京都中央区日本橋室町 1 丁目 6 番 1 号 真洋ビル 6 階
【氏名又は名称】	須藤 政彦

特願 2 0 0 3 - 2 7 2 3 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 3 - 2 7 2 3 9 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 1 4 6 3 1 9 9]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 1 月 3 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市中別府 5 9 0 - 1 4 2

氏 名 坂口 謙吾